

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Juni 2004 (24.06.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/053131 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/52,
C12P 11/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/013728

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Dezember 2003 (04.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 58 127.4 12. Dezember 2002 (12.12.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): CONSORTIUM FÜR ELEKTROCHEMIS-
CHE INDUSTRIE GMBH [DE/DE]; Zielstattstrasse 20,
81379 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DASSLER, Tobias
[DE/DE]; Himalajastrasse 14, 81825 München (DE).

(74) Anwälte: POTTEN, Holger usw.; Wacker-Chemie
GmbH, Zentralbereich PML, Hanns-Seidel-Platz 4, 81737
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, CN, JP, KR,
MX, RU, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

Veröffentlicht:

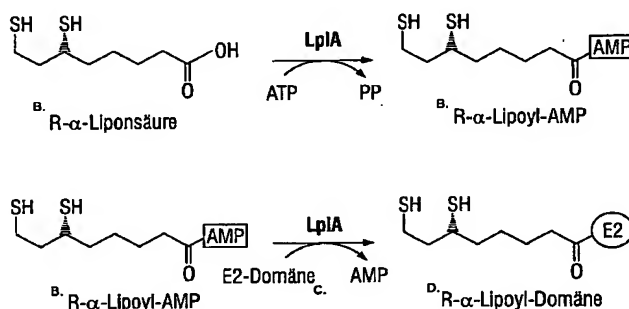
— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF R- α -LIPOIC ACID BY FERMENTATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG VON R- α -LIPONSÄURE

^A Aktivierung und Einbau freier R- α -Liponsäure
bei *E. coli* mittels der Lipoyl-Protein-Ligase A



A. ACTIVATION AND INCORPORATION OF FREE R- α -LIPOIC ACID
IN *E. COLI* BY MEANS OF THE LIPOYL PROTEIN LIGASE A

B. R- α -LIPOIC ACID
C. E2-DOMAIN
D. R- α -LIPOYL DOMAIN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of R- α -lipoic acid by fermentation, characterised in that a cell with a weakened lipoyl protein ligase A activity is cultivated in a culture medium, whereby the cell precipitates enantiomerically pure R- α -lipoic acid in the free form in the culture medium and the enantiomerically pure R- α -lipoic acid is separated off from the culture medium.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/053131 A1



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von R- α -Liponsäure mittels Fermentation, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle, die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- α -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- α -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.

Verfahren zur fermentativen Herstellung von R- α -Liponsäure

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung der R- α -Liponsäure und für das Verfahren besonders geeignete Zellen.

R- α -Liponsäure ist in einer Vielzahl von Pro- und Eukaryonten ein essentieller Cofaktor bestimmter Multienzymkomplexe. Dabei ist die R- α -Liponsäure jeweils mit seiner Carboxylgruppe unter Bildung eines sogenannten Lipoamids kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines spezifischen Lysin-Rests des entsprechenden Enzyms gebunden. Auf diese Weise ist die R- α -Liponsäure ein Teil der E2-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) [EC 2.3.1.12] bzw. der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH) [EC 2.3.1.61] und spielt dort als Redoxpartner und Acylgruppen-überträger eine entscheidende Rolle bei der oxidativen Decarboxylierung von α -Ketosäuren. Außerdem fungiert R- α -Liponsäure als Aminomethyl-Carrier in Glycin-Cleavage Enzymsystemen.

α -Liponsäure ist ein optisch aktives Molekül mit einem Chiralitätszentrum am Kohlenstoffatom C6. Dabei stellt die R-Konfiguration der α -Liponsäure das natürlich vorkommende Enantiomer dar. Nur diese Form zeigt physiologische Aktivität als Cofaktor der entsprechenden Enzyme. α -Liponsäure kann sowohl in einer oxidierten (5-[1,2]-Dithiolan-3-yl-Pentansäure) als auch in einer reduzierten Form (6,8-Dimercapto-Oktansäure) vorkommen. Im Folgenden sind unter der Bezeichnung " α -Liponsäure" beide Formen sowie die jeweiligen Salze der α -Liponsäure, wie z. B. das Calcium-, Kalium-, Magnesium-, Natrium- oder das Ammoniumsalz, zu verstehen.

Die Biosynthese von R- α -Liponsäure wurde besonders an dem Bakterium *Escherichia coli* intensiv untersucht (s. Fig. 1). Hier dient Oktansäure, die an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) kovalent gebunden ist, als spezifische Vorstufe bei der Liponsäure-Synthese. In einer komplexen Reaktion werden zwei Schwefelatome auf die derart aktivierte Oktansäure (Oktanoyl-

ACP) übertragen, wobei R- α -Lipoyl-ACP entsteht. Diese Reaktion wird von der Liponsäure-Synthase [EC 2.8.1.-], dem *lipA*-Genprodukt, katalysiert. Als Schwefeldonor dient dabei letztendlich die Aminosäure L-Cystein. Der anschließende Transfer der R- α -Liponsäure von R- α -Lipoyl-ACP auf die E2-Untereinheit der α -Ketosäure-Dehydrogenasen wird von der Lipoyl-Protein-Ligase B [EC 6.-.-.-], dem *lipB*-Genprodukt, katalysiert, ohne dass dabei jedoch R- α -Lipoyl-ACP oder R- α -Liponsäure als freie Zwischenprodukte auftreten (Miller et al., 2000, Biochemistry 39:15166-15178).

E. coli kann aber auch freie R- α -Liponsäure aus dem umgebenden Medium aufnehmen und für die Bildung funktioneller α -Ketosäure-Dehydrogenasen verwenden. Dazu wird R- α -Liponsäure zunächst mittels ATP zu R- α -Lipoyl-AMP aktiviert und anschließend auf die entsprechenden Enzym-Untereinheiten übertragen (s. Fig. 2). Beide Aktivitäten werden von der Lipoyl-Protein-Ligase A [EC 6.-.-.-], dem *lplA*-Genprodukt, katalysiert (Morris et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 16091-16100). Diese LplA-Aktivität ist für Wildtypstämme von *E. coli* allerdings nicht essentiell, wenn die endogene Liponsäure-Synthese und der Transfer der Lipoyl-Gruppe über den LipA/LipB-Weg erfolgt. So wurden beispielweise *lplA*-Mutanten beschrieben, die keine nachweisbare Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität mehr besitzen, deren Phänotyp aber unter normalen Wachstumsbedingungen nicht von einer Wildtyp-Zelle zu unterscheiden ist (Morris et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 16091-16100; Morris et al., 1995, J. Bacteriol. 177: 1-10).

Über die Biosynthese von R- α -Liponsäure in Eukaryonten ist wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass die R- α -Liponsäure-Synthese sowie der Transfer auf die entsprechenden Enzyme in den Mitochondrien eukaryontischer Zellen auf ähnliche Weise wie in Bakterien erfolgt.

Neben ihrer Relevanz als essentieller Bestandteil von Enzymen mit einer zentralen Rolle im Stoffwechsel, wurde schon früh

die Bedeutung der α -Liponsäure für die Pharmakotherapie sowie für die Nahrungsmittelergänzung (Nutraceutical) erkannt: α -Liponsäure besitzt aufgrund ihrer beiden Thiolgruppen eine ausgeprägte Wirksamkeit als Antioxidans und kann deshalb den Organismus vor schädlichen Prozessen, die durch oxidativen Stress induziert werden, schützen. Außerdem ist α -Dihydroliponsäure, die reduzierte Form der α -Liponsäure, aufgrund ihrer Eigenschaft als starkes Reduktionsmittel in der Lage, andere oxidierte natürliche Antioxidationsmittel im Körper wie Ascorbinsäure oder α -Tocopherol direkt oder indirekt zu regenerieren oder bei deren Mangel diese auch zu ersetzen. Entsprechend kommt der α -Liponsäure im Zusammenspiel mit Ascorbinsäure, α -Tocopherol und Glutathion, dem sogenannten "Netzwerk der Antioxidantien", eine zentrale Bedeutung zu. α -Liponsäure wird außerdem zur Prävention und Bekämpfung von Diabetes mellitus Typ II und dessen Folgeschäden, wie z. B. Polyneuropathie, Cataract oder Kardiovaskularleiden, eingesetzt.

Die unterschiedliche biologische Aktivität beider Enantiomere der α -Liponsäure ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen, wobei sich allerdings immer mehr herauskristallisiert, dass die Applikation des reinen R-Enantiomers der α -Liponsäure deutliche Vorteile gegenüber der S-Form aufweist. So wurde im *in vitro*-Versuch gezeigt, dass nur die natürliche R- α -Liponsäure zur Bildung funktioneller α -Ketosäure-Dehydrogenasen führt. Das S-Enantiomer hatte dagegen sogar einen inhibierenden Effekt auf die Stimulierung der Enzymaktivität durch R- α -Liponsäure. Die Reduktion von α -Liponsäure und damit die Regeneration der antioxidativ wirksamen α -Dihydroliponsäure in den Mitochondrien ist für die Zelle von essentieller Bedeutung. Die mitochondriale NADH-abhängige Lipoamid-Reduktase von Säugern zeigt mit dem R-Enantiomer eine fast 20-fach höhere Aktivität als mit der S-Form. Des weiteren hat R- α -Liponsäure verglichen mit dem S-Enantiomer einen deutlich stärkeren Effekt auf die insulin-vermittelte Glucose-Aufnahme und den Glucose-Metabolismus von Skelettmuskelzellen insulin-resistenter Ratten. Im Tierversuch zeigte die R-Form außerdem

einen antiphlogistischen Effekt, während die S-Form eher eine analgetische Wirkung hatte. Um unerwünschte Nebeneffekte zu vermeiden, ist es daher äußerst wünschenswert, α -Liponsäure jeweils nur in der enantiomerenreinen Form zu applizieren.

5

Derzeit erfolgt die großtechnische Herstellung von α -Liponsäure ausschließlich mittels chemischer Verfahren, wobei immer das Razemat aus R- und S-Form als Endprodukt gebildet wird (Yadav et al., 1990, J. Sci. Ind. Res. 49: 400-409). Zur Gewinnung von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Beispielsweise kann das Razemat der α -Liponsäure oder eines der Syntheseintermediate entweder chemisch mittels chiraler Hilfssubstanzen (Walton et. al, 1954, J. Amer. Chem. Soc. 76: 4748; DE 4137773) oder enzymatisch (Adger et al., 1995, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 1563-1564) aufgespalten werden. In anderen Verfahren unterbleibt die Entstehung eines Razemats aufgrund eines enantioselektiven Syntheseschritts, wobei das neue Chiralitätszentrum entweder chemisch (DE 3629116; DE 19533881; Bringmann et al., 1999, Z. Naturforsch. 54b: 655-661; DE 10036516) oder durch eine stereospezifische Biotransformation mittels Mikroorganismen eingeführt werden kann (Gopalan und Jacobs, 1989, Tetrahedron Lett. 30: 5705-5708; Dasaradhi et al., 1990, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 729-730; DE 10056025). Andere Prozesse wiederum starten die chemische Synthese von enantiomerenreiner α -Liponsäure mit einem natürlich vorkommenden chiralen Edukt wie z. B. S-Maleinsäure oder D-Mannitol (Brookes und Golding, 1988, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: 9-12; Rama Rao et al., 1987, Tetrahedron Lett. 28, 2183-2186). Wegen z. T. aufwendiger Syntheseschritte, geringer Ausbeuten und hoher Materialkosten sind alle bekannten Methoden zur Herstellung von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure derzeit nicht wirtschaftlich.

25

30

Die großtechnische Herstellung vieler niedermolekularer Naturstoffe, wie z.B. Antibiotika, Vitamine oder Aminosäuren erfolgt heute oftmals mittels eines fermentativen Verfahrens unter Verwendung verschiedener Stämme von Mikroorganismen.

35

Die Anmeldungen am Deutschen Patent- und Markenamt mit den Aktenzeichen 10235270.4 und 10245993.2 beschreiben ein Verfahren, bei dem die Produktion von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure ausschließlich in einem Fermentationsprozeß erfolgt.

5 Dabei werden Zellen eingesetzt, die ein Liponsäure-Synthase-Gen bzw. ein Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen einzeln oder auch in Kombination überexprimieren. Die Produktion von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure erfolgt allerdings in noch sehr beschränktem Ausmaß, so dass diese fermentativen Verfahren
10 derzeit noch nicht mit der chemischen Synthese konkurrieren können.

Nur in seltenen Fällen führt jedoch eine einzige genetische Manipulation im Zuge des sogenannten "metabolic engineering"
15 eines Wildtypstammes zur Überproduktion der gewünschten Verbindung in ausreichendem Umfang. Vielmehr ist dazu eine Kombination von gezielten genetischen Manipulationen notwendig, oftmals noch ergänzt durch klassische Mutagenese/Screening-Ansätze.

20 Entsprechend ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein leistungsfähigeres Verfahren zur fermentativen Herstellung von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure bereitzustellen.

25 Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle, die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- α -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und
30 die enantiomerenreine R- α -Liponsäure vom Kulturmedium abgetrennt wird.

Unter einer abgeschwächten Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität ist im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zu verstehen, dass die intrazelluläre Aktivität des LplA-Proteins in
35 der Zelle im Vergleich zu einer Wildtyp-Zelle um 25 bis 100 %, besonders bevorzugt um 75 bis 100 %, verringert ist. Ganz be-

sonders bevorzugt ist die intrazelluläre Aktivität des LplA-Proteins völlig ausgeschaltet.

5 Aus physiologischen und biochemischen Daten geht hervor, dass Liponsäure in Wildtyp-Zellen nahezu ausschließlich in gebundener Form vorkommt, da bereits die Synthese der R- α -Liponsäure vollständig proteingebunden erfolgt (vgl. Fig. 1) (Herbert und Guest, 1975, Arch. Microbiol. 106: 259-266; Miller et al., 2000, Biochemistry 39:15166-15178). Die Lipoyl-Protein-Ligase A ist nicht an der *de novo*-Synthese von R- α -Liponsäure betei-
10 ligt, vielmehr besteht die Aktivität dieses Enzyms in der Kopplung von freier R- α -Liponsäure an die E2-Untereinheiten von α -Ketosäure-Dehydrogenasen. Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass eine Verringerung oder die vollständige Aus-
15 schaltung der Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität in einem Wildtyp-Stamm zur Anhäufung freier, enantiomerenreiner R- α -Liponsäure im Kulturmedium dieser Zellen führt, obwohl sowohl in einem *E. coli* Wildtyp-Stamm als auch in einer *lplA*-Mutante alle Lipoyl-Bindestellen der E2-Untereinheiten mit R- α -
20 Liponsäure abgesättigt sind (Packman et al., 1991, Biochem. J. 277: 153-158; Morris et al., 1995, J. Bacteriol. 177: 1-10) und somit das Substrat des LplA-Proteins (eine unbeladene E2-Untereinheit) fehlt. Darüber hinaus ist die Expression des *lplA*-Gens in einem *E. coli* Wildtyp-Stamm ohnehin nur äußerst
25 schwach. Entsprechend kommen nur wenige Moleküle (< 10) der Lipoyl-Protein-Ligase A in einer Zelle vor (Green et al., 1995, Biochem. J. 309: 853-862). Es ist daher umso erstaunlicher, dass nun eine Verringerung oder vollständige Ausschaltung der Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität die Exkretion von
30 R- α -Liponsäure zur Folge hat.

Die Ausscheidung freier R- α -Liponsäure aus den Zellen erlaubt eine einfache Isolierung des Produkts aus dem Kulturmedium nach Abtrennung der Biomasse, ohne dass die Zellen zuvor auf-
35 gebrochen werden müssen bzw. ohne dass die R- α -Liponsäure durch einen aufwendigen und verlustreichen Hydrolyseschritt vom daran gebundenen Trägerprotein (ACP oder die E2-Untereinheit der α -Ketosäure-Dehydrogenasen) abgespalten werden muss.

Unter der vom *lplA*-Gen codierten Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität ist diejenige Lipoyl-Protein-Ligase-Aktivität einer Zelle zu verstehen, welche eine deutliche Substratpräferenz für freie R- α -Liponsäure im Vergleich zu R- α -Lipoyl-ACP aufweist. Das *LplA*-Protein hat mit freier R- α -Liponsäure etwa eine 100-fach höhere Aktivität, als mit R- α -Lipoyl-ACP. Damit unterscheidet sich die Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität einer Zelle eindeutig von der Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität, welche R- α -Lipoyl-ACP gegenüber freier R- α -Liponsäure als Substrat bevorzugt (s. Fig. 1 und 2).

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Lipoyl-Protein-Ligase A-Gen um ein Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder um eine funktionelle Variante dieses Gens.

Unter einer funktionellen Variante ist im Sinne der vorliegenden Erfindung eine DNA-Sequenz zu verstehen, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz ableitet, wobei die enzymatische Aktivität und Spezifität der durch das Gen codierten Lipoyl-Protein-Ligase A erhalten bleibt.

Das Lipoyl-Protein-Ligase A-Gen codiert für ein Protein umfassend die Sequenz ID NO: 2 oder funktionelle Varianten mit einer Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 35 %.

Vorzugsweise ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 60 %, besonders bevorzugt ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 80 %.

In der vorliegenden Erfindung beziehen sich alle erwähnten Homologiewerte auf Ergebnisse, die mit dem Algorithmus GAP (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GCG) Madison, Wisconsin) erhalten werden.

Dem Fachmann sind zur Abschwächung einer Enzymaktivität in einer Zelle eine Reihe von Möglichkeiten bekannt. Eine Abschwä-

5 chung kann beispielsweise durch Verminderung der Expression des entsprechenden Gens erzielt werden oder durch Austausch des chromosomalen Wildtyp-Gens gegen ein mutiertes Allel, das für ein Enzym mit einer verminderten Aktivität codiert. Im Extremfall kann die Enzymaktivität auch völlig ausgeschaltet werden.

Die Expression eines Gens kann zum Beispiel durch folgende Maßnahmen verringert oder verhindert werden:

- 10 - Abschwächung des Promotors durch geeignete Basensubstitutionen
- Inaktivierung/Veränderung eines für die Expression nötigen Transkriptionsaktivators
- Abschwächung von Translationsstartsignalen (z. B. Ribosomen-
15 bindestelle, Startcodon) durch geeignete Basensubstitutionen
- Entfernung von mRNA-stabilisierenden Regionen des Gens
- Überexpression von für spezifische Antisense-RNA codierenden DNA-Bereichen
- Deletion des gesamten Gens oder zumindest eines wichtigen
20 Teils davon
- Zerstörung des Gens durch Insertion von beispielsweise einer Antibiotikumsresistenzkassette

25 Mutierte Allele eines Gens, die für ein Enzym mit einer verminderten Aktivität codieren, können beispielsweise durch folgende Maßnahmen erzeugt werden:

- Einführung von Leserasterverschiebungen in das entsprechende Gen aufgrund von Nukleotid-Deletionen oder -Insertionen
- Einführung spezifischer Basensubstitutionen im Gen, welche
30 den Austausch von konservierten oder von für die Aktivität essentiellen Aminosäuren zur Folge haben

Mutierte Allele des *lplA*-Gens können mit Standardmethoden der Molekularbiologie erzeugt werden. Eine bevorzugte Möglichkeit
35 dafür besteht in der Einführung spezifischer Basensubstitutionen in das Gen. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass während der Amplifikation des *lplA*-Gens mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Verwendung von speziellen

mutagenen Primern die Basensequenz des Gens oder seines Promotors an einer oder mehreren Positionen spezifisch verändert werden (ortspezifische Mutagenese).

Besonders bevorzugt ist die Einführung einer Deletion in das *lplA*-Gen. Dies kann dadurch erreicht werden, dass das Gen nach der Amplifikation mittels PCR unter Einsatz von spezifischen Primern, die das komplette *lplA*-Gen erfassen, zunächst in einen Plasmid-Vektor (z.B. pUC18, pBR322, pACYC184) kloniert wird. Durch Restriktion des so erhaltenen Plasmids mit geeigneten Restriktionsendonukleasen, die nur im Bereich des *lplA*-Gens schneiden, können interne Regionen des Gens entfernt werden. Auf diese Weise kann nach Religation des restringierten Plasmids eine interne Deletion in das *lplA*-Gen eingeführt werden. Alternativ zur Religation des im *lplA*-Gen restringierten Plasmids kann auch eine Antibiotikumsresistenzkassette in das *lplA*-Gen kloniert werden.

Methoden zum Austausch einer beliebigen chromosomalen DNA-Sequenz gegen eine zwar homologe, aber durch Baseninsertionen, -deletionen oder -substitutionen veränderte Sequenz sind dem Fachmann bekannt. So kann in *Escherichia coli* beispielsweise das von Link et al. (1997, J. Bacteriol. 179: 6228-6237) beschriebene System verwendet werden, um mittels integrativer Plasmide über den Mechanismus der homologen Rekombination die chromosomale Wildtyp-Sequenz des *lplA*-Gens gegen ein mutiertes *lplA*-Allel auszutauschen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Zellen eingesetzt, die enantiomerenreine R- α -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretieren und eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweisen, wobei sie anstelle eines Wildtyp *lplA*-Gens ein *lplA*-Allel besitzen, das eine Basensubstitution im Bereich der Basenpaare 367-465 aufweist, welche dazu führt, dass das LplA-Protein eine um mindestens 50 % verminderte Aktivität hat, oder eine Deletion im *lplA*-Gen aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch eine Zelle mit vorgenannten Eigenschaften.

5 Vorzugsweise ist die Aktivität des LplA-Proteins um 50 bis 100%, besonders bevorzugt um 75% bis 100%, vermindert.

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zellen führt eine Basensubstitution in dem genannten Genbereich dazu, dass keine Aktivität des LplA-Proteins mehr nachweisbar ist.

15 In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zellen befindet sich auf dem Chromosom des Wirtsorganismus nur noch ein durch eine interne Deletion erzeugtes Fragment des *lplA*-Gens, welches nicht mehr für eine funktionelle Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität codieren kann.

20 Zellen mit abgeschwächter Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität lassen sich dadurch herstellen, dass in eine Ausgangszelle anstelle des *lplA*-Wildtyp-Gens ein *lplA*-Allel codierend für ein LplA-Protein mit einer um mindestens 50 % im Vergleich zum Wildtyp-Protein verminderten Aktivität eingebracht wird.

25 In einer Vielzahl von pro- und eukaryontischen Zellen bzw. Organismen konnten Gene, die für eine Lipoyl-Protein-Ligase A codieren, sowie Gene, die für die *de novo*-Synthese von R- α -Liponsäure benötigt werden (z.B. *lipA*, *lipB*), identifiziert werden. Erfindungsgemäße Zellen lassen sich somit vorzugsweise aus Zellen von pro- oder eukaryontischen Organismen herstellen, die in der Lage sind, R- α -Liponsäure selbst zu synthetisieren (Ausgangszelle), die rekombinanten Verfahren zugänglich sind und die durch Fermentation kultivierbar sind. Auch pflanzliche oder tierische Zellen, die in Zellkultur züchtbar sind, sind somit zur Herstellung erfindungsgemäßer Zellen geeignet.

35

Zur Herstellung erfindungsgemäßer Zellen können Ausgangszellen verwendet werden, die bisher noch keinerlei Manipulation unterzogen wurden.

5 Des weiteren ist es jedoch möglich, die erfindungsgemäßen Zellen auch mit Maßnahmen zu kombinieren, die bereits zu einer verbesserten Produktion von R- α -Liponsäure führen. So sind beispielsweise solche Zellen besonders geeignet, die durch eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Expression des *lipA*-
10 Gens bereits eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Liponsäure-Synthase-Aktivität aufweisen und/oder durch eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Expression des *lipB*-Gens bereits über eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität verfügen. Die Herstellung von Zellen mit einer im
15 Vergleich zum Wildtyp verstärkten Liponsäure-Synthase-Aktivität und/oder einer im Vergleich zum Wildtyp verstärkten Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität sind in den Patentanmeldungen DE 10235270 und DE 10245993 beschrieben.

20 Die Erfindung betrifft somit insbesondere auch Zellen, die zusätzlich zur um mindestens 50 % verminderten oder fehlenden Aktivität des LplA-Proteins durch eine verstärkte Expression des *lipA*-Gens über eine erhöhte Liponsäure-Synthase-Aktivität oder durch eine verstärkte Expression des *lipB*-Gens bereits
25 über eine erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität verfügen.

Bevorzugt handelt es sich bei den Zellen um Mikroorganismen, wie zum Beispiel Hefe- oder Bakterienstämme. Besonders bevorzugt handelt es sich um Bakterienstämme aus der Familie der
30 Enterobacteriaceae, ganz besonders bevorzugt um Stämme der Art *Escherichia coli*.

Die Gewinnung von R- α -Liponsäure aus dem Kulturmedium kann nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie beispielsweise
35 Zentrifugation des zellhaltigen Kulturmediums zur Abtrennung der Zellen und durch anschließende Extraktion und/oder Präzipitation des Produkts, erfolgen.

Die Kultivierung der erfindungsgemäßen Zellen zur Produktion von R- α -Liponsäure erfolgt vorzugsweise in einem aus der Literatur bekannten Minimalsalzmedium (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272).

5 Als Kohlenstoffquelle können prinzipiell alle verwertbaren Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren bzw. deren Salze verwendet werden. Dabei werden bevorzugt Asparaginsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Brenztraubensäure, Fumarsäure, Glutaminsäure, Glucose, Glycerin oder Oxalessigsäure eingesetzt.
10 Besonders bevorzugt sind Bernsteinsäure und Oxalessigsäure. Auch ist eine kombinierte Fütterung mehrerer verschiedener Kohlenstoffquellen möglich. Des weiteren können kurzkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C2-C8, bevorzugt mit einer Kettenlänge von C6-C8 (Hexan- bzw. Oktansäure), als spezielle Vorstufen für die α -Liponsäure-Synthese dem Medium
15 zugesetzt werden. Dabei beträgt die Konzentration der zugesetzten Kohlenstoffquelle vorzugsweise 0,1-30 g/l.

Die Inkubation der erfindungsgemäßen Zellen erfolgt vorzugsweise unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 - 150 h und im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur.

Als optimaler Temperaturbereich werden 15 - 55 °C bevorzugt.
25 Besonders bevorzugt ist eine Temperatur zwischen 30 und 37 °C.

Der Nachweis und die Quantifizierung der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten R- α -Liponsäure erfolgt beispielsweise mittels eines Bioassays unter Verwendung eines liponsäureauxotrophen Indikatorstammes (*lipA*-Mutante). Diese Art der turbidimetrischen Quantifizierung von R- α -Liponsäure ist aus der Literatur bekannt (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272). Der im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendete Indikatorstamm W1485lip2 (ATCC 25645) würde allerdings
30 auch ohne supplementierte R- α -Liponsäure wachsen, wenn das Medium neben Glucose auch noch Acetat und Succinat enthält. Um ein falschpositives Wachstum des Indikatorstammes im Bioassay
35 bei der Bestimmung der produzierten R- α -Liponsäure zu vermei-

den - beispielsweise verursacht durch einen Eintrag von Glucose und den vom Produktionsstamm zusätzlich zur R- α -Liponsäure ausgeschiedenen Säuren Acetat und Succinat - erfolgt bereits die Anzucht des R- α -Liponsäure-Produzenten bevorzugt mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle. Dieser Stamm wird mit dem Kulturüberstand einer erfindungsgemäßen Zellanzucht supplementiert; anhand des Wachstums des Indikatorstammes kann dann der Liponsäure-Gehalt im Kulturmedium bestimmt werden.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Der Bakterienstamm *Escherichia coli* W3110 Δ lplA, der für die Ausführung der Beispiele verwendet wurde, wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM 15299 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt. Die Plasmide pKP477 und pBAD-lipB sind in der Patentanmeldung DE 10245993 beschrieben.

Beispiel 1: Konstruktion einer chromosomalen Mutation im lplA-Gen des Wirtsorganismus

A) Amplifikation des lplA-Gens

Das lplA-Gen aus *E. coli* wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung der Pwo-DNA-Polymerase nach gängiger, dem Fachmann bekannter Praxis amplifiziert. Als Matrice diente die chromosomale DNA des *E. coli*-Wildtypstammes W3110 (ATCC 27325). Als Primer wurden die 3'-phosphorothioat-geschützten Oligonukleotide lplA-fwd und lplA-rev mit folgenden Sequenzen verwendet:

lplA-fwd: (SEQ ID NO: 3)
5'- CGG GAT CCC TAT CTG CGC CTG ACA CTC GAC -3'
BamHI

lplA-rev: (SEQ ID NO: 4)
5'- CGG GAT CCT TTA TCT GAA CCG CCA TTT GCG CTG -3'
BamHI

Das bei der PCR erhaltene DNA-Fragment mit einer Länge von ca. 1,6 kb wurde anschließend mittels eines DNA-Adsorptions-

säulchens des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt.

B) Konstruktion des Plasmids pKO3- Δ lplA

5 In das PCR-Fragment wurden über die Primer-Sequenzen Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI (Erkennungssequenz in den Oligonukleotiden unterstrichen) eingeführt. Das gereinigte PCR-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten, anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt und
10 dann mittels des GENECLAN Kits (BIO 101 Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert.

Zur Klonierung des *lplA*-Gens wurde der Vektor pUC18 (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg, Deutschland) mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten, anschließend durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert und dann wie das PCR-Fragment mittels der GENECLAN-Methode gereinigt.

20 Die Ligation des PCR-Fragments mit dem geschnittenen und dephosphorylierten Vektor erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung der T4-DNA-Ligase. Die Transformation von *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 α mit dem Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde auf
25 LB-Ampicillin-Agarplatten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 100 mg/l Ampicillin) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die gewünschten Transformanten wurden nach einer Plasmidisolierung mittels eines QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durch eine Restriktionsanalyse identifiziert.

30 Das auf diese Weise erhaltene Plasmid trägt die Bezeichnung pUC18-*lplA*.

35 Um nun eine interne Deletion in das *lplA*-Gen einzuführen, wurde der Vektor pUC18-*lplA* mit den Restriktionsenzymen *Nru*I und *Stu*I, die jeweils einmal innerhalb des *lplA*-Gens schneiden, verdaut und der Vektor wie oben beschrieben mittels T4-DNA-

Ligase religiert, anschließend transformiert und überprüft. Dadurch wurde ein zentraler Bereich des *lplA*-Gens um 197 Basenpaare deletiert und gleichzeitig eine Leserasterverschiebung eingeführt, wodurch das Gen inaktiviert wurde. Das
5 resultierende Plasmid pUC18- Δ *lplA*, das nun den verkürzten Leserahmen " Δ *lplA*" enthält, wurde mit dem Enzym *Bam*HI geschnitten und das 1,4 kb DNA-Fragment, welches das Δ *lplA*-Genfragment beinhaltet, wurde in den ebenfalls mit *Bam*HI geschnittenen Vektor pKO3 (Link et al., 1997, J. Bacteriol. 179: 6228-6237)
10 kloniert. Das auf diese Weise erhaltene Plasmid trägt die Bezeichnung pKO3- Δ *lplA*.

C) Austausch des chromosomalen *lplA*-Wildtyp-Gens gegen das deletierte *lplA*-Allel aus pKO3- Δ *lplA*
15 Das Plasmid pKO3- Δ *lplA* wurde wie oben beschrieben mittels Transformation in den Stamm W3110 eingebracht, wobei plasmidtragende Klone über die dadurch erworbene Chloramphenicol-Resistenz (20 mg/l Chloramphenicol) selektiert werden konnten. Der Austausch des chromosomalen *lplA*-Wildtyp-Gens gegen das
20 deletierte Δ *lplA*-Allel aus pKO3- Δ *lplA* erfolgte mittels homologer Rekombination entsprechend der Prozedur von Link et al. (1997, J. Bacteriol. 179: 6228-6237), wobei durch Ausplattieren der Zellen auf LB-Saccharose-Agarplatten gleichzeitig auf Auflösung der Cointegrate sowie auf Verlust des Plasmids, welches nun das *lplA*-Wildtyp-Gen enthielt, selektiert werden
25 konnte. Saccharose-resistente Einzelkolonien wurden mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide *lplA*-fwd (SEQ ID NO: 3) und *lplA*-rev (SEQ ID NO: 4) überprüft, ob der chromosomale Austausch des *lplA*-Wildtyp-Gens gegen die deletierte Variante
30 Δ *lplA* erfolgreich war. Der auf diese Weise erzeugte Stamm trägt die Bezeichnung W3110 Δ *lplA*.

Beispiel 2: Herstellung von R- α -Liponsäure-Produzenten

Das *lipB*-Überexpressionsplasmid pBAD-*lipB* wurde mittels
35 Elektroporation in die *E. coli*-Stämme W3110 Δ *lplA* und W3110 transformiert und nach Selektion auf LB-Agarplatten mit 100 mg/l Ampicillin wurde das Plasmid aus jeweils einer der Transformanten reisoliert, mit Restriktionsendonukleasen gespalten

und überprüft. Mit dem Kontrollplasmid pKP477, das neben dem Ampicillin-Resistenzgen nur die Regulationssequenzen des Arabinose-Operons von *E. coli* (*araC*-Gen, *araBAD*-Promotorregion) enthält, wurde in analoger Weise verfahren.

5

Beispiel 3: Fermentative Produktion von R- α -Liponsäure

Für die fermentative Produktion von R- α -Liponsäure wurden die in Beispiel 2 genannten Stämme sowohl mit als auch ohne Plasmid verwendet. Als Vorkultur für die Produktionsanzucht wurden
 10 zunächst 5 ml LB-Flüssigmedium, das 100 mg/l Ampicillin enthielt, mit dem jeweiligen Stamm beimpft und für 16 h bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit dem entsprechenden Volumen steriler Saline (0,9 % NaCl) gewaschen.
 15 Mit den auf diese Weise vorbereiteten Zellen wurden schließlich 15 ml BS-Medium (7 g/l K₂HPO₄; 3 g/l KH₂PO₄; 1 g/l (NH₄)₂SO₄; 0,1 g/l MgSO₄ x 7 H₂O; 0,5 g/l Na₃Citrat x 3 H₂O; 0,2% säurehydrolysiertes Casein (vitaminfrei); 13,5 g/l Na₂Succinat x 6 H₂O; pH 6,8 mit HCl eingestellt), das außerdem
 20 100 mg/l Ampicillin enthielt, im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Inkubation der Produktionskulturen erfolgte bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler. Die Expression des Lipoyl-Protein-Ligase B-Gens auf dem Plasmid pBAD-lipB wurde durch Zugabe von 0,2 g/l L-Arabinose nach ca. 4 h Inkubation induziert.
 25 Nach 24 h Inkubation wurden Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt. Die darin enthaltene R- α -Liponsäure wurde mittels des bekannten turbidimetrischen Bioassays (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A: 269-272) quantifiziert. Tabelle 1 zeigt die erzielten Gehalte freier R- α -Liponsäure im jeweiligen Kultur-
 30 überstand nach 24 h Inkubation:

Tabelle 1:

Stamm	R- α -Liponsäure [μ g/l]
W3110	0
W3110 Δ lp1A	25

W3110 pKP477	0
W3110 Δ lplA pKP477	27
W3110 pBAD-lipB	25
W3110 Δ lplA pBAD-lipB	191


PCT

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 13.11.2003 12:31:59 PM

0-1	Formular - PCT/RO/134 (EASY) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material erstellt durch Benutzung von	PCT-EASY Version 2.92 (aktualisiert 01.07.2003)
0-1-1		
0-2	Internationales Aktenzeichen.	
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	Co 10227

1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	13
1-2	Zelle	7-11
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	15 November 2002 (15.11.2002)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 15299
1-4	Weitere Angaben	KEINE
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten
1-6	Gesondert eingereichte Angaben Diese Angaben werden dem Internationalen Büro später übermittelt	KEINE

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der internationalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein) JA	GRIET MATTHYS 
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim Internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

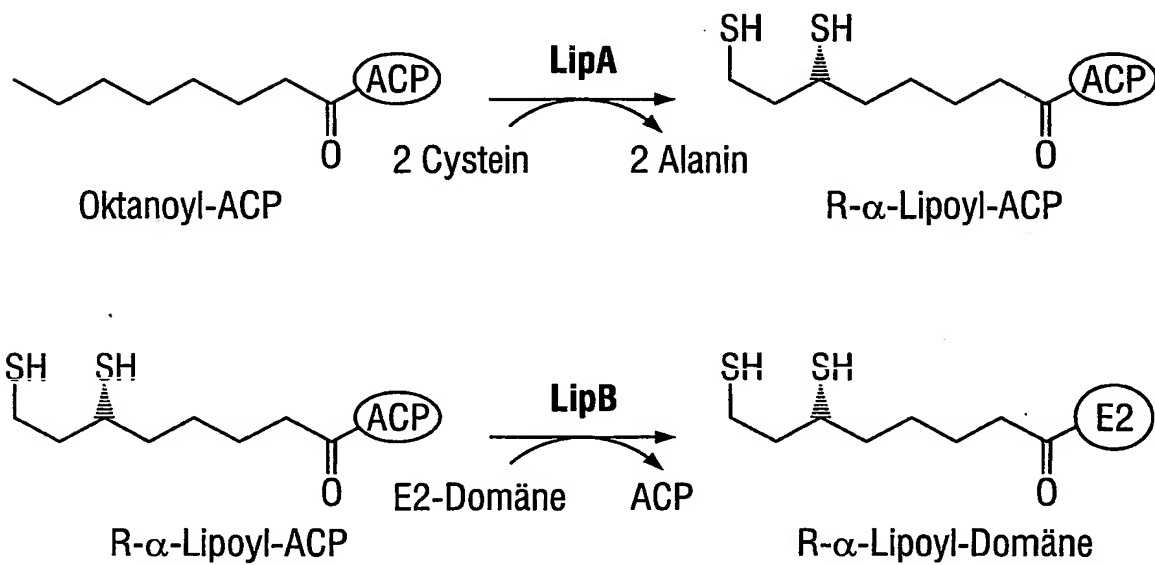
Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung enantiomerenreiner R- α -Liponsäure, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle,
5 die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- α -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- α -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.
- 10 2. Zelle, die enantiomerenreine R- α -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretiert und eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass sie anstelle eines Wildtyp *lplA*-Gens ein *lplA*-Allel be-
15 sitzt, das eine Basensubstitution im Bereich der Basenpaare 367-465 aufweist, welche dazu führt, dass das *LplA*-Protein eine um mindestens 50 % verminderte Aktivität hat, oder eine Deletion im *lplA*-Gen aufweist.
- 20 3. Zelle nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass keine Aktivität des *LplA*-Proteins mehr nachweisbar ist.
4. Zelle nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie über eine erhöhte Liponsäure-Synthase-Aktivität oder
25 über eine erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität verfügt.
5. Zelle nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Mikroorganismus wie zum Beispiel ein Hefe-
30 oder Bakterienstamm ist.
6. Zelle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Bakterienstamm aus der Familie der Enterobacteriaceae, bevorzugt die Art *Escherichia coli*, ist.
- 35 7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Zelle, die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-

Aktivität aufweist, eine Zelle gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 6 eingesetzt wird.

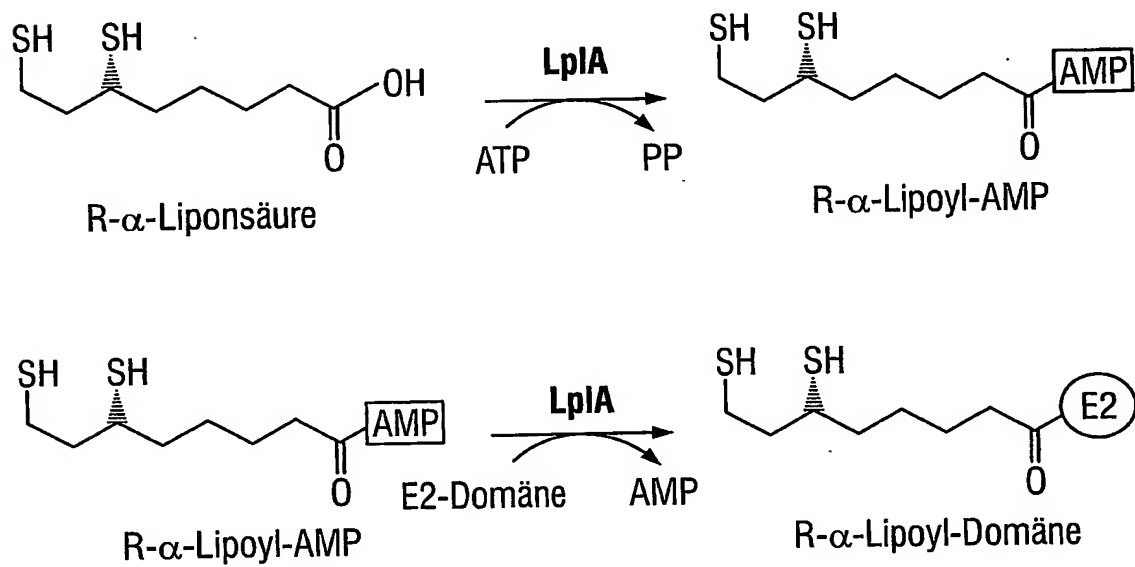
- 5 8. Verfahren nach Anspruch 1 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung der enantiomerenreinen R- α -Liponsäure durch Zentrifugation des zellhaltigen Kulturmediums und anschließende Extraktion oder Präzipitation der R- α -Liponsäure aus dem zellfreien Kulturmedium erfolgt.
- 10 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 7 oder 8 dadurch gekennzeichnet, dass im Kulturmedium eine Kohlenstoffquelle ausgewählt aus der Gruppe der verwertbaren Zucker, Zuckeralkohole oder organischen Säuren eingesetzt wird.
- 15 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C2-C8, bevorzugt mit einer Kettenlänge von C6-C8 (Hexan- bzw. Oktansäure), dem Kulturmedium zugesetzt werden.
- 20 11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Kohlenstoffquelle in einer Konzentration von 0,1-30 g/l verwendet wird.
- 25 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass eine Inkubation der Zellen über einen Zeitraum von 16 - 150 h im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur erfolgt.

1 / 2

Fig. 1: Synthese der R- α -Liponsäure in *E. coli*

2 / 2

Fig. 2: Aktivierung und Einbau freier R- α -Liponsäure bei *E. coli* mittels der Lipoyl-Protein-Ligase A



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH

5 <120> Zellen und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung
von R-alpha-Liponsaeure

<130> Co 10227

10 <140>
<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1017
<212> DNA

20 <213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1014)

25 <300>
<301> Morris, Timothy W.
Reed, Kelynn E.
Cronan Jr., John E.

30 <302> Identification of the Gene Encoding Lipoate-Protein
Ligase A of Escherichia coli

<303> J. Biol. Chem.
<304> 269
<305> 23

35 <306> 16091-16100
<307> 1994

<400> 1

40 atg tcc aca tta cgc ctg ctc atc tct gac tct tac gac ccg tgg ttt 48
Met Ser Thr Leu Arg Leu Leu Ile Ser Asp Ser Tyr Asp Pro Trp Phe
1 5 10 15

aac ctg gcg gtg gaa gag tgt att ttt cgc caa atg ccc gcc acg cag 96
Asn Leu Ala Val Glu Glu Cys Ile Phe Arg Gln Met Pro Ala Thr Gln
45 20 25 30

cgc gtt ctg ttt ctc tgg cgc aat gcc gac acg gta gta att ggt cgc 144
Arg Val Leu Phe Leu Trp Arg Asn Ala Asp Thr Val Val Ile Gly Arg
35 40 45

50 gcg cag aac ccg tgg aaa gag tgt aat acc cgg cgg atg gaa gaa gat 192
Ala Gln Asn Pro Trp Lys Glu Cys Asn Thr Arg Arg Met Glu Glu Asp
50 55 60

	aac gtc cgc ctg gcg cgg cgc agt agc ggt ggc ggc gcg gtg ttc cac	240
	Asn Val Arg Leu Ala Arg Arg Ser Ser Gly Gly Gly Ala Val Phe His	
	65 70 75 80	
5	gat ctc ggc aat acc tgc ttt acc ttt atg gct ggc aag ccg gag tac	288
	Asp Leu Gly Asn Thr Cys Phe Thr Phe Met Ala Gly Lys Pro Glu Tyr	
	85 90 95	
10	gat aaa act atc tcc acg tcg att gtg ctc aat gcg ctg aac gcg ctc	336
	Asp Lys Thr Ile Ser Thr Ser Ile Val Leu Asn Ala Leu Asn Ala Leu	
	100 105 110	
15	ggc gtc agc gcc gaa gcg tcc gga cgt aac gat ctg gtg gtg aaa acc	384
	Gly Val Ser Ala Glu Ala Ser Gly Arg Asn Asp Leu Val Val Lys Thr	
	115 120 125	
20	gtc gaa ggc gac cgc aaa gtc tca ggc tcg gcc tat cgc gaa acc aaa	432
	Val Glu Gly Asp Arg Lys Val Ser Gly Ser Ala Tyr Arg Glu Thr Lys	
	130 135 140	
25	gat cgc ggc ttc cac cac ggc acc ttg cta ctc aat gcc gac ctc agc	480
	Asp Arg Gly Phe His His Gly Thr Leu Leu Leu Asn Ala Asp Leu Ser	
	145 150 155 160	
30	cgc ctg gca aac tat ctc aat ccg gat aaa aag aaa ctg gcg gcg aaa	528
	Arg Leu Ala Asn Tyr Leu Asn Pro Asp Lys Lys Lys Leu Ala Ala Lys	
	165 170 175	
35	ggc att acg tcg gta cgt tcc cgc gtg acc aac ctc acc gag ctg ttg	576
	Gly Ile Thr Ser Val Arg Ser Arg Val Thr Asn Leu Thr Glu Leu Leu	
	180 185 190	
40	ccg ggg atc acc cat gag cag gtt tgc gag gcc ata acc gag gcc ttt	624
	Pro Gly Ile Thr His Glu Gln Val Cys Glu Ala Ile Thr Glu Ala Phe	
	195 200 205	
45	ttc gcc cat tat ggc gag cgc gtg gaa gcg gaa atc atc tcc ccg aac	672
	Phe Ala His Tyr Gly Glu Arg Val Glu Ala Glu Ile Ile Ser Pro Asn	
	210 215 220	
50	aaa acg cca gac ttg cca aac ttc gcc gaa acc ttt gcc cgc cag agt	720
	Lys Thr Pro Asp Leu Pro Asn Phe Ala Glu Thr Phe Ala Arg Gln Ser	
	225 230 235 240	
55	agc tgg gaa tgg aac ttc ggt cag gct ccg gca ttc tcg cat ctg ctg	768
	Ser Trp Glu Trp Asn Phe Gly Gln Ala Pro Ala Phe Ser His Leu Leu	
	245 250 255	
60	gat gaa cgc ttt acc tgg ggc ggc gtg gaa ctg cat ttc gac gtt gaa	816
	Asp Glu Arg Phe Thr Trp Gly Gly Val Glu Leu His Phe Asp Val Glu	
	260 265 270	
65	aaa ggc cat atc acc cgc gcc cag gtg ttt acc gac agc ctc aac ccc	864
	Lys Gly His Ile Thr Arg Ala Gln Val Phe Thr Asp Ser Leu Asn Pro	
	275 280 285	

gcg ccg ctg gaa gcc ctc gcc gga cga ctg caa ggc tgc ctg tac cgc 912
 Ala Pro Leu Glu Ala Leu Ala Gly Arg Leu Gln Gly Cys Leu Tyr Arg
 290 295 300

5

gca gat atg ctg caa cag gag tgc gaa gcg ctg ttg gtt gac ttc ccg 960
 Ala Asp Met Leu Gln Gln Glu Cys Glu Ala Leu Leu Val Asp Phe Pro
 305 310 315 320

10

gaa cag gaa aaa gag cta cgg gag tta tcg gca tgg atg gcg ggg gct
 1008
 Glu Gln Glu Lys Glu Leu Arg Glu Leu Ser Ala Trp Met Ala Gly Ala
 325 330 335

15

gta agg tag
 1017
 Val Arg

20

<210> 2
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

25

<400> 2
 Met Ser Thr Leu Arg Leu Leu Ile Ser Asp Ser Tyr Asp Pro Trp Phe
 1 5 10 15

30

Asn Leu Ala Val Glu Glu Cys Ile Phe Arg Gln Met Pro Ala Thr Gln
 20 25 30

Arg Val Leu Phe Leu Trp Arg Asn Ala Asp Thr Val Val Ile Gly Arg
 35 40 45

35

Ala Gln Asn Pro Trp Lys Glu Cys Asn Thr Arg Arg Met Glu Glu Asp
 50 55 60

Asn Val Arg Leu Ala Arg Arg Ser Ser Gly Gly Gly Ala Val Phe His
 65 70 75 80

40

Asp Leu Gly Asn Thr Cys Phe Thr Phe Met Ala Gly Lys Pro Glu Tyr
 85 90 95

45

Asp Lys Thr Ile Ser Thr Ser Ile Val Leu Asn Ala Leu Asn Ala Leu
 100 105 110

Gly Val Ser Ala Glu Ala Ser Gly Arg Asn Asp Leu Val Val Lys Thr
 115 120 125

50

Val Glu Gly Asp Arg Lys Val Ser Gly Ser Ala Tyr Arg Glu Thr Lys
 130 135 140

Asp Arg Gly Phe His His Gly Thr Leu Leu Leu Asn Ala Asp Leu Ser
 145 150 155 160

55

Arg Leu Ala Asn Tyr Leu Asn Pro Asp Lys Lys Lys Leu Ala Ala Lys
 165 170 175
 Gly Ile Thr Ser Val Arg Ser Arg Val Thr Asn Leu Thr Glu Leu Leu
 5 180 185 190
 Pro Gly Ile Thr His Glu Gln Val Cys Glu Ala Ile Thr Glu Ala Phe
 195 200 205
 10 Phe Ala His Tyr Gly Glu Arg Val Glu Ala Glu Ile Ile Ser Pro Asn
 210 215 220
 Lys Thr Pro Asp Leu Pro Asn Phe Ala Glu Thr Phe Ala Arg Gln Ser
 225 230 235 240
 15 Ser Trp Glu Trp Asn Phe Gly Gln Ala Pro Ala Phe Ser His Leu Leu
 245 250 255
 Asp Glu Arg Phe Thr Trp Gly Gly Val Glu Leu His Phe Asp Val Glu
 20 260 265 270
 Lys Gly His Ile Thr Arg Ala Gln Val Phe Thr Asp Ser Leu Asn Pro
 275 280 285
 25 Ala Pro Leu Glu Ala Leu Ala Gly Arg Leu Gln Gly Cys Leu Tyr Arg
 290 295 300
 Ala Asp Met Leu Gln Gln Glu Cys Glu Ala Leu Leu Val Asp Phe Pro
 305 310 315 320
 30 Glu Gln Glu Lys Glu Leu Arg Glu Leu Ser Ala Trp Met Ala Gly Ala
 325 330 335
 Val Arg
 35
 <210> 3
 <211> 30
 40 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
 45 lplA-fwd
 <400> 3
 cgggatccct atctgcgctt gacactcgac 30
 50
 <210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 55

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
lplA-rev5 <400> 4
cgggatcctt tatctgaacc gccatttgcg ctg

33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/13728

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/52 C12P11/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORRIS T W ET AL: "Lipoic Acid Metabolism in Escherichia coli: The lp1A and lp1B Genes Define Redundant Pathways for Ligation of Lipoyl Groups to Apoprotein" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 177, no. 1, January 1995 (1995-01), pages 1-10, XP002268660 ISSN: 0021-9193 das ganze Dokument, siehe vorallem Tabelle 2, S. 8, rechte Spalte, die untersten 13 Zeilen und S.9, rechte Spalte, letzter Absatz -- -- -/-	2-6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 May 2004

Date of mailing of the international search report

03/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lüdemann, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/13728

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GREEN DAWN E ET AL: "Purification and properties of the lipoate protein ligase of Escherichia coli" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 309, no. 3, 1995, pages 853-862, XP009030413 ISSN: 0264-6021 the whole document -----	1-12
A	WO 02/085293 A (CARGILL INC ;LIAO HANS H (US); MCFARLAN SARA C (US)) 31 October 2002 (2002-10-31) the whole document -----	1-12
E	WO 2004/013314 A (DASSLER TOBIAS ;MAIER THOMAS (DE); CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND (DE)) 12 February 2004 (2004-02-12) the whole document -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/13728

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02085293	A	31-10-2002	EP 1390470 A2 WO 02085293 A2	25-02-2004 31-10-2002
WO 2004013314	A	12-02-2004	DE 10235270 A1 WO 2004013314 A1	12-02-2004 12-02-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/13728

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/52 C12P11/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MORRIS T W ET AL: "Lipoic Acid Metabolism in Escherichia coli: The lipA and lipB Genes Define Redundant Pathways for Ligation of Lipoyl Groups to Apoprotein" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, Bd. 177, Nr. 1, Januar 1995 (1995-01), Seiten 1-10, XP002268660 ISSN: 0021-9193 das ganze Dokument, siehe vorallem Tabelle 2, S. 8, rechte Spalte, die untersten 13 Zeilen und S.9, rechte Spalte, letzter Absatz --- -/--	2-6



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'G' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Mai 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/06/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lüdemann, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/13728

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>GREEN DAWN E ET AL: "Purification and properties of the lipote protein ligase of Escherichia coli"</p> <p>BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 309, Nr. 3, 1995, Seiten 853-862, XP009030413 ISSN: 0264-6021 das ganze Dokument</p>	1-12
A	<p>WO 02/085293 A (CARGILL INC ;LIAO HANS H (US); MCFARLAN SARA C (US)) 31. Oktober 2002 (2002-10-31) das ganze Dokument</p>	1-12
E	<p>WO 2004/013314 A (DASSLER TOBIAS ;MAIER THOMAS (DE); CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND (DE)) 12. Februar 2004 (2004-02-12) das ganze Dokument</p>	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abkürzungszeichen

PCT/EP 03/13728

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02085293	A	31-10-2002	EP 1390470 A2	25-02-2004
			WO 02085293 A2	31-10-2002
WO 2004013314	A	12-02-2004	DE 10235270 A1	12-02-2004
			WO 2004013314 A1	12-02-2004

This Page Blank (uspto)